

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ЯКІСНОГО АНАЛІЗУ СТРЕПТОЦИДУ РОЗЧИННОГО НА ОСНОВІ ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ**Євтіфєєва О.А., Мордінсон А.Ю., Савченко Л.П., Георгіянец В.А.***Національний фармацевтичний університет (Харків)*

Вступ. Із аптечних лікарських засобів на основі стрептоциду розчинного, які користуються найбільшим попитом, були обрані водні розчини з концентраціями 0,80 %, 1,00 % та 2,00 %, які затверджені наказом № 391 МОЗ України [1, 2]. Для визначення якості виготовлення аптечних лікарських форм (ЛФ), виготовлених про запас, вимагається проведення хімічного контролю, однією з складових якого є якісний аналіз компонентів. Методики ідентифікації стрептоциду розчинного не приводяться в жодній діючій Фармакопеї: ні в Європейській, ні в Німецькій, ні в Британській, ні в Американській, ні в ДФУ [3-7].

ДФ СРСР X видання на субстанцію стрептоциду розчинного наводить специфічну реакцію із саліциловою та концентрованою сірчаною кислотами для розрізнення стрептоциду розчинного і стрептоциду; реакцію на первинні ароматичні аміни, що проходить після попереднього кислотного гідролізу та реакцію на іон натрію – при горінні препарату стрептоциду розчинного полум'я забарвлюється у жовтий колір [8].

Для підтвердження наявності аналізованої речовини стрептоциду розчинного у випробовуваних аптечних розчинах нами було обрано провести валідацію методик ідентифікації за реакціями на первинні ароматичні аміни після кислотного гідролізу, а також із саліциловою та концентрованою сірчаною кислотами. Перша реакція дозволяє визначити належність молекули стрептоциду розчинного до групи сульфаніламідів, а друга дозволить відрізнити стрептоцид розчинний від стрептоциду у разі помилкового використання при виготовленні лікарських засобів (ЛЗ) в умовах аптеки.

Дослідження методик ідентифікації проводили згідно з діючими вимогами ДФУ, з визначенням достовірності аналітичного ефекту реакції на всьому аналітичному діапазоні застосування методики від 80 % до 120 % від номінальної концентрації за прописом та специфічності, з використанням реактивів і реагентів, що зазначені у ДФУ. Процедуру валідації методик ідентифікації проводили згідно із стандартизованим підходом, що детально описаний у праці [9].

Матеріали та методи дослідження. При проведенні дослідження використовували: ваги АВ 204/А METTLER TOLEDO; рН-метр РВ-11 фірми «Sartorius AG» (Німеччина); субстанцію стрептоциду розчинного (виробництво Ірбітського хімікофармацевтичного заводу, РФ), яка відповідає вимогам АНД до р.п. № UA/4375/01/01; реактиви, які відповідають вимогам ДФУ.

Приготування модельних розчинів: готували п'ять розчинів згідно з діапазоном застосування методики для 0,80 %, 1,00 % та 2,00 % розчинів від 80 % до 120 % з точними наважками відповідно до концентрацій: m г стрептоциду розчинного поміщають в мірну колбу місткістю 100,00 мл, додають 70,00 мл теплої води Р, розчиняють. Після повного розчинення об'єм розчину доводять водою Р до мітки та перемішують.

Методика визначення стрептоциду розчинного за реакцією азосполучення: до 1,00 мл (0,80 %) або до 0,50 мл (1,00 %, 2,00 %) препарату додають 2,00 мл води Р, 1,00-2,00 мл розчину кислоти хлористоводневої розведеної Р1 та кип'ячать протягом 1 хв. на водяному нагрівачі. Далі до охолодженого розчину додають 3 краплі 0,1 М розчину натрію нітриту, збовтують. Отриманий розчин вливають у 3,00 мл розчину β -нафтолу (для 0,80 % та 1,00 % розчинів) або до 2,00 мл розчину β -нафтолу (для 2,00 % розчину) і спостерігають вишнево-червоне забарвлення.

Методика визначення стрептоциду розчинного за реакцією з саліциловою кислотою: до 1,00 мл (0,80 %; 1,00 %) або до 0,50 мл (2,00 %) препарату додають 2,00 мл розчину кислоти сірчаної концентрованої, додають 0,01 г саліцилової кислоти та нагрівають на водяній бані. Спостерігають малинове забарвлення.

Результати дослідження та їх обговорення. За досліджуваною методикою [8] використовують розчин субстанції з концентрацією 50,00 мг/мл. Для відтворення умов цієї реакції в аналізованих розчинах було визначено аліквоти ЛФ, в яких вміст стрептоциду розчинного дорівнював вмісту відповідно вимогам випробуваної методики: для 0,80 % розчину аліквота для аналізу дорівнює 6,25 мл; для 1,00 % розчину – 5,00 мл; для 2,00 % розчину – 2,50 мл. Використовувати для ідентифікації 0,80 % розчину понад 6,00 мл ЛФ не зовсім практично. Також виникає питання, як на протікання реакції та її ефект впливає надлишок води. Тому важливо було визначити мінімальну граничну концентрацію стрептоциду розчинного за цієї реакцією та встановити оптимальне співвідношення реагентів реакції і аліквот ЛФ для аналізу.

Ефект реакції для випробовуваних розчинів досліджували спочатку на 1,00 мл 0,80 % розчину з різними співвідношеннями мл β -нафтолу, тобто 1:1, 1:2 та 1:3. Результати дослідження реакції при співвідношенні 1:1 показали, що забарвлення розчинів не відповідає забарвленню за стандартною методикою, тобто аналітичний ефект реакції не спостерігається (табл. 1). Кінцевий продукт реакції не утворюється. Середня достовірність реакції дорівнює $R=27,00$ %. При дослідженні ефекту реакції при співвідношенні 1:2 з'ясувалося, що зі збільшенням кількості реагенту β -нафтолу достовірність отримання результатів зростає. Результати статистичної обробки експериментальних даних при дослідженні реакції при співвідношенні реагентів 1:3 доводять, що воно є найбільш прийнятним. Ймовірність виявлення стрептоциду розчинного у цій реакції збільшується від 27,00 % до 96,00 % (табл. 1). Чутливість реакції $C_{0,95}$ досягається при концентрації 7,2 мг/мл.

Для вибору кількості реагенту β -нафтолу для 1,00 % та 2,00 % розчинів стрептоциду розчинного також досліджували залежність ефекту реакції від об'єму доданого розчину β -нафтолу. На підставі отриманих результатів для інших випробовуваних ЛФ стрептоциду розчинного ре-

комендовано оптимальне співвідношення: для 1,00 % розчину – 1,00 мл ЛФ та 3,00 мл розчину β-нафтолу; для 2,00 % розчину – 0,50 мл ЛФ та 2,00 мл розчину β-нафтолу. Експериментально

доведено, що достовірність ефекту реакції азосполучення на всьому діапазоні застосування для випробовуваних ЛФ перевищує 96,00 % (табл. 2).

Таблиця 1. Результати дослідження достовірності ефекту реакції азосполучення

Вміст стрептоциду розчинного, мг	Об'єм розчину β-нафтолу, мл								
	1,00			2,00			3,00		
	α	P	R, %	α	P	R, %	α	P	R, %
6,40	0,82	0,18	18,30	0,57	0,43	43,30	0,08	0,92	91,70
7,20	0,75	0,25	25,00	0,52	0,48	48,30	0,05	0,95	95,00
8,00	0,62	0,38	38,30	0,35	0,65	65,00	0,03	0,97	96,70
8,80	0,75	0,25	25,00	0,32	0,68	68,30	0,02	0,98	98,30
9,60	0,72	0,28	28,30	0,27	0,73	73,30	0,02	0,98	98,30
Холостий	0,98	0,02	0,17	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Загальне середнє	0,73	0,27	27,00	0,34	0,59	59,70	0,04	0,96	96,00

Таблиця 2. Параметри статистичної оцінки результатів реакції азосполучення

Розчини стрептоциду розчинного, %	Діапазон застосування, %	Аліквота ЛФ для аналізу, мл	Аліквота розчину β-нафтолу, мл	— Середні значення *		
				α	P	R, %
0,80	80-120	1,00	3,00	0,04	0,96	96,00
1,00		1,00	3,00	0,04	0,96	96,30
2,00		0,50	2,00	0,02	0,98	98,30

* - значення достовірності є середнім значенням достовірності ефекту реакції за даними трьох лабораторій (n=300).

Реакція стрептоциду розчинного із саліциловою кислотою відбувається за рахунок того, що молекула стрептоциду розчинного під дією концентрованої сірчаної кислоти гідролізується, що приводить до виділення формальдегіду, який в свою чергу, із саліциловою кислотою дає ауриновий барвник, забарвлений у червоний колір. За методикою: 0,05 г субстанції розчиняють у 0,50 мл концентрованої сірчаної кислоти. Додають 0,01 г саліцилової кислоти та нагрівають на водяному нагрівачі; спостерігається малинове забарвлення. У нашому випадку препарати стрептоциду розчинного є вод-

ними розчинами. Щоб попередньо оцінити залежність ефекту реакції від вмісту аналіту та кількості води, для кожного з випробовуваних розчинів стрептоциду розчинного реакцію проводили з використанням діапазону аліквот для аналізу від 0,50 мл до 2,50 мл (крок по 0,50 мл). Залежність ефекту реакції від кількості реактиву сірчаної кислоти, що додається, досліджували на діапазоні аліквот 0,50 мл, 1,00 мл, 1,50 мл та 2,00 мл. Для кожної аліквоти розчину стрептоциду випробовування проводили 10 разів. Результати експерименту представлені в табл. 3.

Таблиця 3. Результати дослідження достовірності ефекту реакції стрептоциду розчинного з саліциловою кислотою та з різними аліквотами сірчаної кислоти

Вміст стрептоциду розч., мг	Число негативних результатів при аліквоті сірчаної кислоти			Частота виявлення α			Частота невиявлення α	Ймовірність виявлення P	Достовірність R, %
	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	лаб.1 α	лаб.2 α	лаб.3 α			
0,50 мл H₂SO₄									
4	9	8	10	0,95	0,90	1,00	0,95	0,05	5,00
8	8	7	6	0,90	0,85	0,80	0,85	0,15	15,00
12	6	4	4	0,80	0,70	0,70	0,73	0,27	27,03
16	3	3	2	0,60	0,65	0,55	0,60	0,40	40,27
20	2	3	5	0,45	0,40	0,50	0,45	0,55	55,11
Холостий	10	10	10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Середнє значення							0,72	0,28	28,48
1,00 мл H₂SO₄									
4	5	5	6	0,50	0,50	0,60	0,53	0,47	47,0
8	5	5	4	0,50	0,50	0,40	0,47	0,53	53,0
12	3	5	4	0,30	0,50	0,40	0,40	0,60	60,0
16	4	3	5	0,40	0,30	0,50	0,40	0,60	60,0
20	4	2	3	0,40	0,20	0,30	0,30	0,70	70,0
Холостий	10	10	10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Середнє значення							0,42	0,58	58,00
1,50 мл H₂SO₄									
4	4	2	3	0,40	0,20	0,30	0,30	0,70	70,0
8	2	2	3	0,20	0,20	0,30	0,23	0,77	77,0
12	2	2	2	0,20	0,20	0,20	0,20	0,80	80,0
16	2	2	1	0,20	0,20	0,10	0,16	0,84	84,0
20	2	1	1	0,20	0,10	0,10	0,13	0,86	86,6
Холостий	10	10	10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Середнє значення							0,2	0,79	79,52
2,00 мл H₂SO₄									
4	0	1	1	0,00	0,10	0,10	0,07	0,93	93,0
8	0	1	0	0,00	0,10	0,00	0,03	0,96	96,6
12	1	0	0	0,10	0,00	0,00	0,10	0,96	96,6
16	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,0
20	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,0
Холостий	10	10	10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Середнє значення							0,04	0,96	97,24

Вивчення впливу концентрованої сірчаної кислоти на результат реакції показало, що при збільшенні кількості реагенту до 2,00 мл малинове забарвлення розчину виникає при використанні 1,00 мл 0,80 % розчину стрептоциду розчинного з достовірністю 96,60 %.

Таблиця 4. Параметри статистичної оцінки достовірності ефекту реакції з саліциловою та сірчаною кислотами

Розчини стрептоциду, %	Діапазон застосування, %	Середнє значення *		
		Частота не виявлення $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, \bar{P}	Достовірність R, %
0,80	80-120	0,04	0,96	96,30
1,00		0,03	0,96	95,70
2,00		0,05	0,95	95,30

* - значення достовірності є середнім значенням достовірності ефекту реакції за даними трьох лабораторій (n=300).

Опрацьовані та валідовані методики ідентифікації за своїми статистичними характеристиками відповідають вимогам ДФУ, що дозволяє рекомендувати їх для здійснення якісного аналізу при контролі якості випробовуваних екстемпоральних ЛФ.

Висновки. 1. Для хімічних реакцій ідентифікації стрептоциду розчинного у водних розчинах аптечного виготовлення з концентраціями 0,80 %, 1,00 % та 2,00 % встановлено оптимальне співвідношення реагентів реакцій ідентифікації і аліквот ЛФ для аналізу.

Параметри статистичної оцінки достовірності ефекту цієї реакції в рамках діапазону концентрацій від 80 % до 120 % відповідно до номінального вмісту для випробовуваних розчинів за запропонованою методикою наведені в табл. 4.

2. Достовірність ефекту випробовуваних хімічних реакцій на всьому аналітичному діапазоні концентрацій $\pm 20,00$ % від номінальної за прописом перевищує прийнятні значення довірчої ймовірності 95,00 %, які регламентовані ДФУ.

3. Статистичними показниками опрацьованих та валідованих методик ідентифікації на основі хімічних реакцій відповідають вимогам ДФУ, що дозволяє рекомендувати оптимізовані методики для здійснення якісного аналізу при контролі якості випробовуваних екстемпоральних ЛФ.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек / за ред. проф. **О. І. Тихонова, проф. Т. Г. Ярних.** – К., 2005. – 98 с.
2. Вимоги до виготовлення стерильних та асептичних лікарських засобів в умовах аптек / за ред. проф. **О. І. Тихонова, проф. Т. Г. Ярних.** – К.: МОЗ України, 2005. – 76 с.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е видання. – X.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. – 3308 p.
5. Deutsches Arzneibuch.: Kommentar. – 9-th ed. – Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2000. – P. 3941–3943.
6. British Pharmacopoeia / The British Pharmacopoeia Secretariat. – London, 2009. – Vol. 1. – 10952 p.
7. The USP Pharmacists' Pharmacopoeia. – 2-nd ed. – Rockville, 2008. – 1519 p.
8. Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. – 1080 с.
9. **Євтіфєєва О. А.** Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських препаратів / **О. А. Євтіфєєва** // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – № 1 (7). – С. 19–24.

Євтіфєєва О.А., Мордінсон А.Ю., Савченко Л.П., Георгіянц В.А. Валідація методик якісного аналізу стрептоциду розчинного на основі хімічних методів // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 1. – С. 42–44.

З метою здійснення якісного аналізу стрептоциду розчинного у складі аптечних водних розчинів було проведено оптимізацію та валідацію методик на основі хімічних реакцій. Для кожної обраної методики встановлено оптимальне співвідношення аліквот лікарських форм і реагентів. Доведено, що опрацьовані методики можуть бути застосовані при здійсненні контролю якості екстемпоральних лікарських форм на основі стрептоциду розчинного.

Ключові слова: екстемпоральні лікарські засоби, стрептоцид розчинний, валідація методик якісного аналізу.

Євтіфєєва О.А., Мордінсон А.Ю., Савченко Л.П., Георгіянц В.А. Валідація методик якісного аналізу стрептоцида розчинного на основі хімічних методів // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 1. – С. 42–44.

С целью осуществления качественного анализа стрептоцида растворимого в составе аптечных водных растворов были проведены оптимизация и валидация методик на основе химических реакций. Для каждой испытуемой методики установлено оптимальное соотношение аликвот лекарственных форм и реагентов. Доказано, что проанализированные методики могут быть использованы при осуществлении контроля качества экстенпоральных лекарственных форм на основе стрептоцида растворимого.

Ключевые слова: экстенпоральные лекарственные средства, стрептоцид растворимый, валидация методик качественного анализа.

Yevtifeyeva O.A., Mordinson A.Y., Savchenko L.P., Georgiyants V.A. The validation of methods of high-quality analysis of the streptocidum soluble on the basis of chemical methods // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 1. – С. 42–44.

The optimization and validation of the methods on the basis of chemical reactions with the purpose of realization of high-quality analysis of streptocidum soluble in the extemporaneous water solutions were carried out. For every method that tests, the optimum correlation of the aliquots of medicinal forms and reagents were settled. It is well-proven that the analyzed methods can be used during carrying out of quality control of the extemporaneous medicinal forms that contain streptocidum soluble.

Key words: extemporaneous medicinal forms, streptocidum soluble, validation of methods of high-quality analysis.

Надійшла 15.11.2011 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченкова